

Docket No.: NOG-0016
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Kenji Takubo, et al.

Application No.: NEW APPLICATION

Group Art Unit: N/A

Filed: July 22, 2003

Examiner: Not Yet Assigned

For: FLUORESCENCE DETECTION METHOD
AND FLUORESCENCE DETECTION DEVICE

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS

MS Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

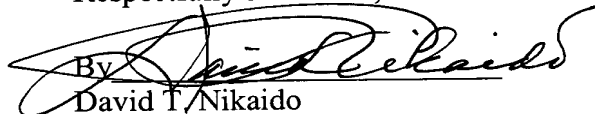
Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2002-217777	July 26, 2002

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is filed herewith. Applicant believes no fee is due with this response. However, if a fee is due, please charge our Deposit Account No. 18-0013, under Order No. from which the undersigned is authorized to draw.

Dated: July 22, 2003

Respectfully submitted,

By 
David T. Nikaido

Registration No.: 22,663
RADER, FISHMAN & GRAUER PLLC
1233 20th Street, N.W., Suite 501
Washington, DC 20036
(202) 955-3750
Attorney for Applicant

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 7月26日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-217777

[ST.10/C]:

[JP2002-217777]

出 願 人

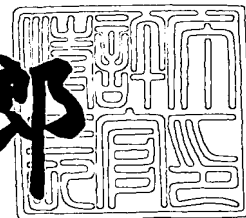
Applicant(s):

株式会社島津製作所

2003年 5月 9日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3033565

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1020268

【提出日】 平成14年 7月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01J 3/00

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

 【氏名】 田窪 健二

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

 【氏名】 中村 伸

【特許出願人】

 【識別番号】 000001993

 【氏名又は名称】 株式会社島津製作所

【代理人】

 【識別番号】 100085464

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 野口 繁雄

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 037017

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 9110906

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光検出方法及び装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 蛍光分子を含む試料溶液を基板で支持し、その基板の裏面側から基板と試料溶液との界面で全反射が起こる入射角度範囲で光を入射させ、その界面付近で発生する近接場により励起された蛍光分子から発生した蛍光を検出する蛍光検出方法において、

前記基板として誘電体基材層／金属薄膜層／誘電体被覆層の積層構造を持つものを使用してその誘電体被覆層と試料溶液とを接触させるようにし、かつ前記金属薄膜層と誘電体被覆層の界面で表面プラズモン共鳴を励起する特定の入射角をもって前記光を入射させることを特徴とする蛍光検出方法。

【請求項 2】 蛍光分子を含む試料溶液を支持する基板と、該基板と試料溶液との界面で全反射が起こる入射角度範囲で光を入射させる照明手段と、前記界面付近で発生する近接場により励起された蛍光分子から発生した蛍光を検出する検出手段とを有する蛍光検出装置において、

前記基板は誘電体基材層／金属薄膜層／誘電体被覆層の積層構造を持ち、その誘電体被覆層が試料溶液と接触するようになっており、

かつ前記照明手段は前記金属薄膜層と誘電体被覆層の界面で表面プラズモン共鳴を励起する特定の入射角をもって光が入射させるように設定されていることを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項 3】 前記照明手段は励起光源として半導体レーザ又は発光ダイオードを備えている請求項 2 に記載の蛍光検出装置。

【請求項 4】 前記検出手段は CCD 又はフォトダイオードである請求項 2 又は 3 に記載の蛍光検出装置。

【請求項 5】 請求項 2 から 4 のいずれかに記載の蛍光検出装置からなる全反射蛍光顕微鏡。

【請求項 6】 請求項 2 から 4 のいずれかに記載の蛍光検出装置からなる生体分子検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、主に生化学分野において用いられる蛍光検出方法と、そのような蛍光検出方法を利用した全反射蛍光顕微鏡（TIRFM: total internal reflection fluorescence microscopy）や生体分子検出装置に関わるものである。

【0002】

【従来の技術】

全反射蛍光顕微鏡は、観察試料層とガラス（スライドガラス又はカバーガラス）界面で入射光を全反射させることにより界面付近に形成される近接場（エバネセント場）を用いて照明を行う、一種の暗視野照明顕微鏡である。全反射蛍光顕微鏡は、主に生化学分野において、生体分子の蛍光観察の目的に用いられる。

【0003】

全反射蛍光顕微鏡は、しばしば単一分子の蛍光を観察する目的に使用されるので、高い検出感度を要求される。このため、従来の全反射蛍光顕微鏡では光源として強力なレーザ光源や、検出器として高感度なカメラ（ICCD（イメージ・インテンシファイアCCD））やPMT（光電子増倍管）を使用する必要があった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

強力なレーザ光源や高感度のカメラは、構成部品として高価で大型であるので、全反射蛍光顕微鏡装置全体としても高価で大型になる。

そこで、本発明は強力なレーザ光源や高感度のカメラを使用しなくても全反射蛍光顕微鏡のような蛍光検出装置や蛍光検出方法を実現できるようにすることを目的とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明の蛍光検出方法は、蛍光分子を含む試料溶液を基板で支持し、その基板の裏面側から基板と試料溶液との界面で全反射が起こる入射角度範囲で光を入射させ、その界面付近で発生する近接場光により励起された蛍光分子から発生した

蛍光を検出する蛍光検出方法であるが、試料溶液を支持する基板として誘電体基材層／金属薄膜層／誘電体被覆層の積層構造を持つものを使用してその誘電体被覆層と試料溶液とを接触させるようにし、かつ金属薄膜層と誘電体被覆層の界面で表面プラズモン共鳴を励起する特定の入射角をもって前記光を入射させることを特徴としている。

【 0 0 0 6 】

また、この蛍光検出方法を実現する本発明の蛍光検出装置は、蛍光分子を含む試料溶液を支持する基板と、この基板と試料溶液との界面で全反射が起こる入射角度範囲で光を入射させる照明手段と、前記界面付近で発生する近接場光により励起された蛍光分子から発生した蛍光を検出する検出手段とを有し、前記基板は誘電体基材層／金属薄膜層／誘電体被覆層の積層構造を持ち、その誘電体被覆層が試料溶液と接触するようになっており、かつ前記照明手段は金属薄膜層と誘電体被覆層の界面で表面プラズモン共鳴を励起する特定の入射角をもって光が入射させるように設定されていることを特徴とするものである。

【 0 0 0 7 】

表面プラズモン共鳴は、誘電体（真空や気体、液体も含む）に接している金属の表面付近の電子のプラズマ振動（表面プラズモン）が、外部からの入射光の交番電場に共鳴する現象であり、その共鳴効果により表面付近のエバネセント場のエネルギー密度（電界強度の2乗）が、金属薄膜がない場合の10倍以上に増強される。

【 0 0 0 8 】

基板と試料溶液層との界面に特定の入射角範囲で光を入射し、その界面で表面プラズモン共鳴を励起してエバネセント場を増強することにより、蛍光の発生効率が高まる。その結果、強力なレーザ光源や高感度なカメラを使用しなくても蛍光検出が可能になる。

【 0 0 0 9 】

本発明において、照明手段として強力なレーザ光源などの光出力の大きいものを使用することを除外するものではない。そのような高出力の照明手段を使用すれば蛍光強度が大きくなってより好ましい。しかし、本発明ではエバネセント場

を増強して蛍光の発生効率が高められているので、励起光源として半導体レーザーや発光ダイオードのような安価な光源を使用することができる。その結果、装置コストを下げることができる。

【 0 0 1 0 】

検出器に関しても同様に、本発明は高感度なカメラを使用することを除外するものではない。そのような高感度な検出器を使用すれば蛍光検出感度が大きくなってより好ましい。しかし、本発明ではエバネセント場を増強して蛍光の発生効率が高められているので、CCD (charge coupled device: 電荷結合素子) やフォトダイオードのような安価な検出器を使用することができる。その結果、装置コストを下げることができる。

【 0 0 1 1 】

励起光源として半導体レーザーや発光ダイオードを使用し、検出器としてCCDやフォトダイオードを使用すれば、小型の装置を実現することもできる。

【 0 0 1 2 】

本発明の蛍光検出装置は、全反射蛍光顕微鏡や生体分子検出装置に適用するのに適する。励起光、蛍光ともに使用される光の波長範囲は特に限定されるものではなく、紫外、可視、赤外など、蛍光が発生する波長領域であれば全て適用することができる。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

表面プラズモン共鳴を励起するための光学配置のうち、最も一般的で有名なものは、図1に示されるKretschmann配置と呼ばれるものであり、ガラスなどの誘電体基材層1と、誘電体基材層1より誘電率の小さい第2の誘電体（水溶液や空気など）3が金属の薄膜2を介して接している構造をもっている。9は屈折率整合媒質又はプリズムである。

【 0 0 1 4 】

Kretschmann配置に光4を入射すると、金属薄膜2がない場合の全反射臨界角より大きい特定の入射角において表面プラズモン共鳴が励起される。表面プラズモン共鳴が励起されると、反射光の強度が急激に減少するので、反射光の強度を

モニターすることにより共鳴条件を確認できる。金属薄膜 2 の材質は一般に銀、金、銅などの高導電率材料が好適であるがこれに限らない。ただし、入射光の波長によっては、金属の電子遷移による吸収が顕著になり表面プラズモン共鳴のエネルギー密度増強効果が小さくなるので、これを避ける必要がある。その点から銀は可視域の広い波長範囲において吸収が小さく、最も好適な材料であるといえる。金属薄膜 2 の厚さは、通常 1 0 ～ 1 0 0 n m が好適である。

【 0 0 1 5 】

Kretschmann 配置をそのまま全反射蛍光顕微鏡に適用して、カバーガラスやスライドガラスなどの誘電体基材層 1 上に形成した金属薄膜 2 に誘電体 3 である試料溶液を直接接触させた構造で表面プラズモン共鳴を励起することも可能であるが、いくつかの問題をともなう。

【 0 0 1 6 】

1) 金属薄膜の化学的不安定性。

銀や銅は、観察前に空気にふれて酸化してしまう。また、溶液試料の種類によっては溶液と反応してしまう。

【 0 0 1 7 】

2) 蛍光分子が数 nm 以下の距離で金属に近接していると蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET: fluorescence resonance energy transfer) が起こり、蛍光が観測できなくなる。

本発明は、誘電体基材層 1 の上に設けられた金属薄膜 2 上に誘電体被覆層を設けて、上記の問題点の解決を図るものである。

【 0 0 1 8 】

(実施例 1)

実施例の 1 つは、図 2 に示されるように、誘電体基材層としての市販のスライドガラス (B K 7) 1 の片面に、イオンビームスパッタ堆積法により金属薄膜としての銀薄膜 (厚さ 5 0 n m) 2 と誘電体被覆層としての SiO_2 膜 (厚さ 1 0 n m) 7 を順に堆積したものを試料溶液の支持基板として用いるものである。

【 0 0 1 9 】

支持基板の SiO_2 膜 7 上に試料溶液 3 を載せ、その上にカバーガラス 8 を載

せる。試料溶液 3 には蛍光分子 5 が含まれている。

ここで、スライドガラス 1 とカバーガラス 8 を入れ替えて、カバーガラス 8 に銀薄膜 2 と SiO_2 膜 7 を堆積してもよい。

【0020】

銀薄膜 2 及び SiO_2 膜 7 の表面は、観察時に背景光となる入射光の直接散乱光を抑えるために、極力平滑である方が望ましく、具体的には二乗平均粗さで 2 nm 以下であることが望ましい。このような薄膜を得る方法として、イオンビームスパッタ堆積法は好適であるがこれに限らない。

【0021】

金属薄膜 2 としては、銀の代わりに金、銅などの他種金属を用いることも可能である。

SiO_2 膜 7 の製膜方法は各種の方法が可能であるが、銀薄膜 2 の酸化を防ぐ目的から銀薄膜作成後、同じ製膜装置内で SiO_2 の製膜を行うのが望ましい。

また、誘電体被覆層 7 の材質としては、 SiO_2 の代わりに、 TiO_2 や Al_2O_3 などの無機誘電体材料のほか、有機透明誘電体材料を用いることも可能である。

【0022】

支持基板の SiO_2 膜 7 上に試料溶液 3 を載せ、その上にカバーガラス 8 を載せた状態で支持基板の裏面側から基板と試料溶液 3 との界面で全反射が起こる入射角度範囲で光を入射させると、その界面付近で発生するエバネセント場により励起された蛍光分子 5 から蛍光 6 が発生する。

【0023】

図 3 には、本実施例のスライドガラス 1 が屈折率 1.35 の試料水溶液 3 に接している系に波長 488 nm のレーザー光を入射したときの、スライドガラス 1 の表面でのエネルギー密度の入射角依存性の計算結果 (A) と、エネルギー反射率の入射角依存性の計算結果 (B) を示す。入射角はスライドガラス 1 の表面の法線とのなす角度である。

それぞれの図で、(a) はこの実施例のものである。対比のために、銀薄膜がない、通常的全反射照明顕微鏡の計算結果 (b) と、 SiO_2 膜がない Kretschma

nn配置での計算結果(c)も示している。実施例を示す(a)でも表面プラズモンによるエネルギー密度増強効果は見られるが、エネルギー密度は SiO_2 膜がない場合に比べて小さくなっていることがわかる。

【0024】

本発明で、「金属薄膜層と誘電体被覆層の界面で表面プラズモン共鳴を励起する特定の入射角」とは、この実施例の場合、図3でエネルギー密度増強効果がみられる $59 \sim 60^\circ$ である。

【0025】

(実施例2)

実施例2は、図4に示されるように、実施例1の SiO_2 膜7の厚さを500nmに変更したものである。

【0026】

図5には、本実施例でもスライドガラス1が屈折率1.35の試料水溶液3に接している系に波長488nmのレーザー光を入射したときの、スライドガラス1の表面でのエネルギー密度の入射角依存性の計算結果(A)と、エネルギー反射率の入射角依存性の計算結果(B)を示す。この場合も、それぞれの図で、(a)はこの実施例のもののほか、銀薄膜がない、通常的全反射照明顕微鏡の計算結果(b)と、 SiO_2 膜がないKretschmann配置での計算結果(c)も示している。

【0027】

この実施例の場合、「金属薄膜層と誘電体被覆層の界面で表面プラズモン共鳴を励起する特定の入射角」とは、図5でエネルギー密度増強効果がみられる 52.5° 付近である。

【0028】

SiO_2 膜7の厚さを光の波長程度に大きくすることにより、 SiO_2 膜7内で多重反射が起こり、結果として表面でのエネルギー密度は SiO_2 膜7がない場合とほぼ同等の値が得られる(図5(A))。このような誘電体被覆層内での多重反射を伴う表面プラズモン共鳴を導波路型表面プラズモン共鳴と呼ぶ。

【0029】

なお、イオンビームスパッタ堆積法で SiO_2 膜を500nmも堆積するのは時間がかかるので、銀薄膜作成後同じ製膜装置で数十nm程度 SiO_2 膜を堆積して空気中での酸化を防いだあと、大気中でスピンコートを用いたゾルゲル法で SiO_2 膜をさらに製膜して、 SiO_2 膜の厚さが合計として500nmになるようにするのが便利である。

【0030】

上記の実施例では誘電体被覆が単一の材質からなるものであったが、別の実施例として誘電体被覆が複数の材質の層からなるものも可能である。この場合、銀薄膜作成後に同じ製膜装置で第1の誘電体層を堆積したのち別の製膜装置で第2層以降の製膜を行うことができる。

【0031】

本発明は全反射蛍光顕微鏡のほか、上記実施例の試料溶液支持基板と同様の基板を用いて、液体クロマトグラフィ又は電気泳動装置の検出部として用いることができる、さらに基板表面に特定の生体分子と相互作用する化学基を修飾して生体分子検出装置を構成することもできる。

【0032】

【発明の効果】

以上のように、本発明では蛍光検出方法において、試料溶液を支持する基板で基板として誘電体基材層／金属薄膜層／誘電体被覆層の積層構造を持つものを使用してその誘電体被覆層と試料溶液とを接触させるようにし、金属薄膜層と誘電体被覆層の界面で表面プラズモン共鳴を励起する特定の入射角をもって光を入射させるようにしたので、エバネセント場を増強することができ、蛍光の発生効率が高まる。

その結果、半導体レーザや発光ダイオードなどの安価で小型の照明手段で装置を構成することができるようになる。また、検出手段もICCDやPMTなどの高価なものではなく、通常のCCDやフォトダイオードなどの安価で小型のものを使用することができるようになる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

代表的な表面プラズモン共鳴の励起方法（Kretschmann配置）を示す要部断面図である。

【図 2】

第 1 の実施例を示す要部断面図である。

【図 3】

同実施例における表面でのエネルギー密度及びエネルギー反射率の入射角依存性を示す図である。

【図 4】

第 2 の実施例を示す要部断面図である。

【図 5】

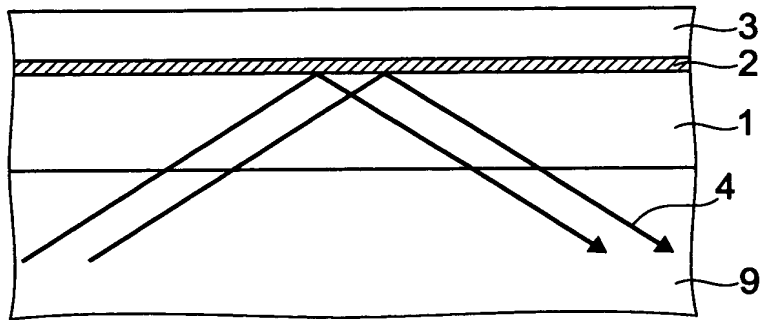
同実施例における表面でのエネルギー密度及びエネルギー反射率の入射角依存性を示す図である。

【符号の説明】

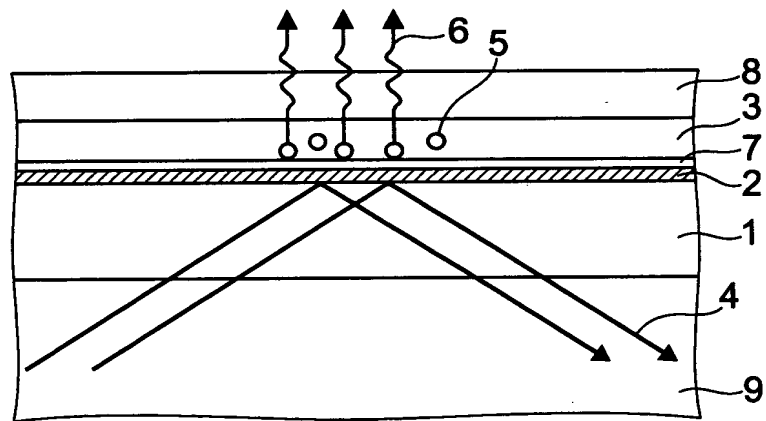
- 1 スライドガラス
- 2 金属薄膜（銀）
- 3 誘電体（観察試料層）
- 4 入射光
- 5 蛍光分子
- 6 蛍光
- 7 誘電体被覆層（ SiO_2 ）
- 8 カバーガラス
- 9 屈折率整合媒質又はプリズム

【書類名】 図面

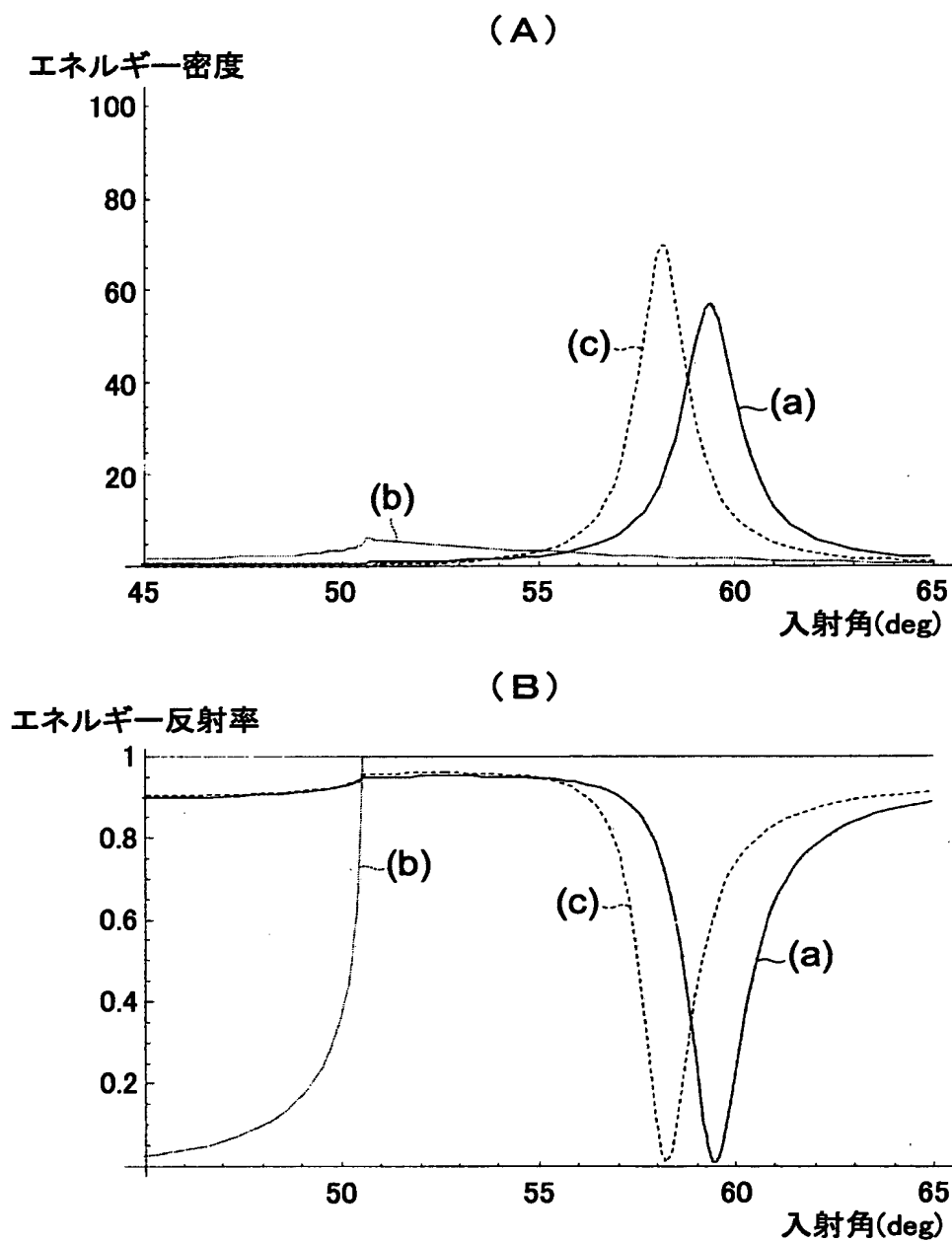
【図 1】



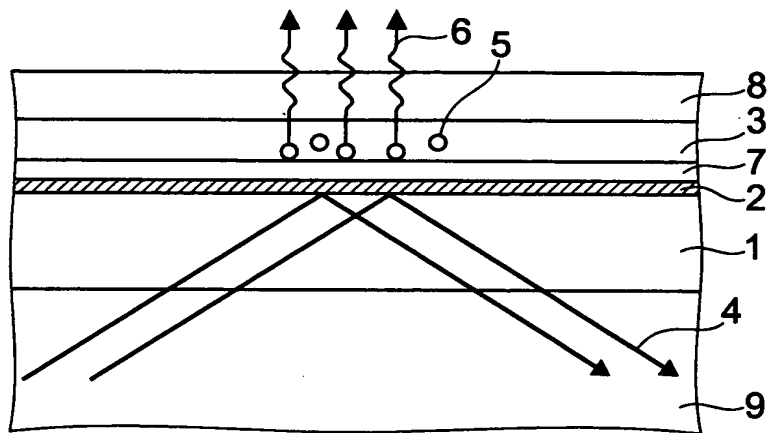
【図 2】



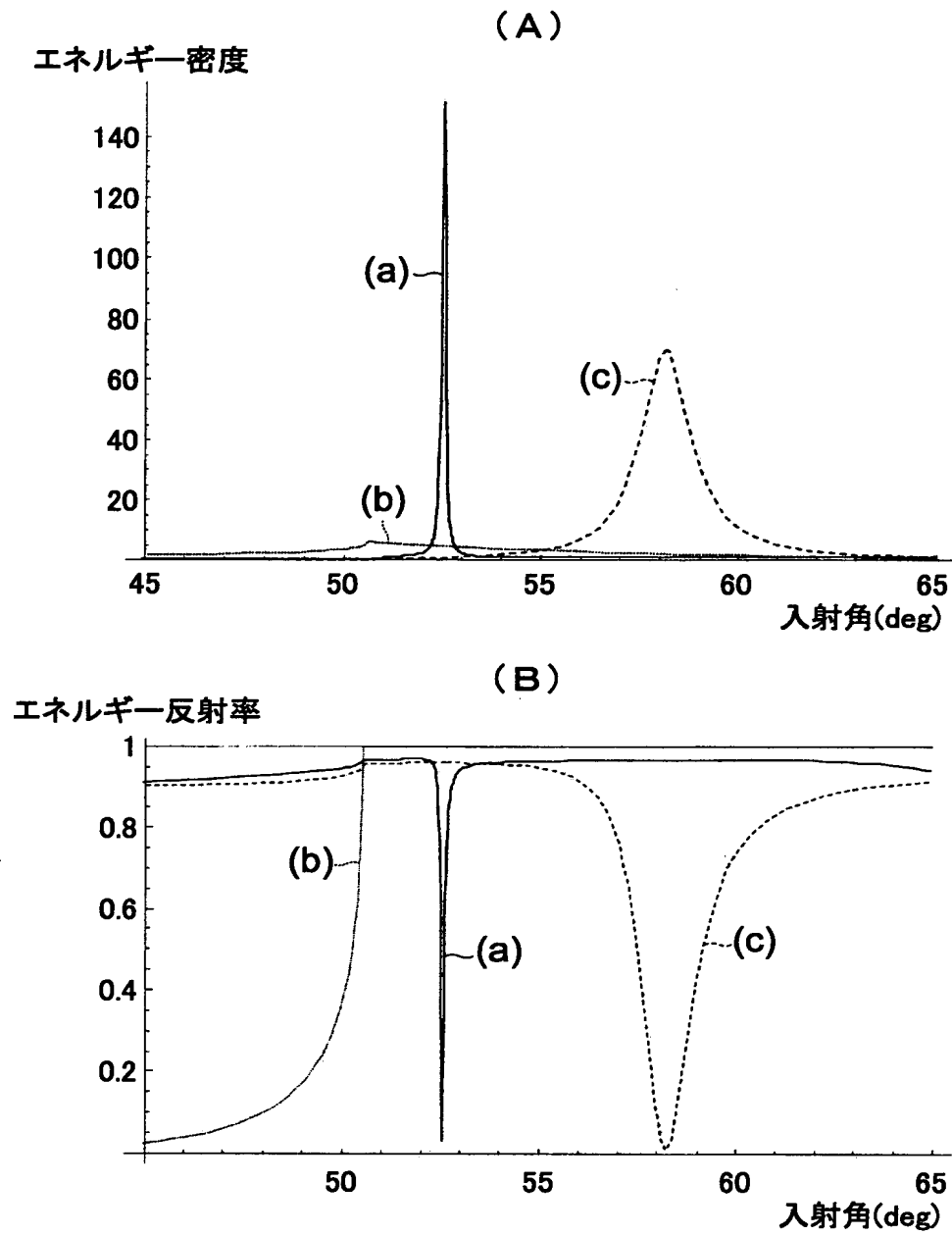
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 強力なレーザ光源や高感度のカメラを使用しなくても蛍光検出をできるようにする。

【解決手段】 スライドガラス 1 の片面に、イオンビームスパッタ堆積法により銀薄膜（厚さ 5 0 n m） 2 と S i O₂膜（厚さ 1 0 n m） 7 を順に堆積したものを試料溶液の支持基板とする。その支持基板の S i O₂膜 7 上に蛍光分子 5 を含む試料溶液 3 を載せ、その上にカバーガラス 8 を載せる。銀薄膜 2 と S i O₂膜 7 の界面に 5 9 ～ 6 0 ° の入射角で光を入射させると、その界面で表面プラズモン共鳴が励起されてエバネセント場が増強され、試料溶液 3 中の蛍光分子 5 からの効率よく蛍光が発生する。

【選択図】 図 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 1 9 9 3]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地
氏 名 株式会社島津製作所